

⑬ 公表 平成5年(1993)6月17日

⑭ Int. Cl. ⁸	機別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分)	3(2)
C 07 C 225/34 A 61 K 31/135 31/155	ADU	7457-4H 8413-4C 8413-4C※				

(全 12 頁)

⑮ 発明の名称 プロテインキナーゼCのビス-(ヒドロキシアルキルアミノ)-アントラキノン阻害剤

⑯ 特 願 平4-500870

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)7月2日

⑱ 出 願 平3(1991)10月30日

⑲ 国際出願 PCT/US91/08026

⑳ 国際公開番号 WO92/07557

㉑ 国際公開日 平4(1992)5月14日

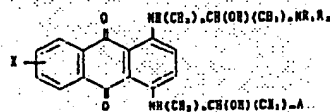
優先権主張 ㉒ 1990年11月5日 ㉓ 米国(US) ㉔ 609,252

⑳ 発 明 者	ジアン, ジャック・ビー	アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27516, チャペル・ヒル, スカイ・ドライブ 1604
㉑ 出 願 人	スフィンクス・ファーマシューティカルズ・コーポレーション	アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27717, デーラム, トウー・ユニバーシティー・プレース (番地なし)
㉒ 代 理 人	弁理士 湯浅 恭三 外6名	
㉓ 指 定 国	AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US	

最終頁に続く

請求の範囲

1. 以下の化学式を有する置換アントラキノン:



【式中、

R₁及びR₂が独立にH、C₁-C₁₀アルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリールであり、又はR₁及びR₂は隣接する窒素原子Nと一緒になって置換又は非置換の環状基を形成し、この環はヘテロ原子を更に任意に含むことが得る; n及びmが独立に1、2、又は3であり; Aがハロゲン、OH、アルコキシ、OCO(NR₃R₄)、S-C(NH₂)=NR₅であり、或いはm=1のときには隣接する窒素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃、R₄、及びR₅が独立にH、アルキル、又はアリールであり; XがH、OH、NR₃R₄、Cl、Br、I、F、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、COOR₆、又はCONR₇R₈であり; そしてR₃、R₄、R₅、及びR₆が独立にH、低級アルキル、又はアリールである】。

2. R₁及びR₂が独立にH又は低級アルキルであり; n及びmが独立に1又は2であり; Aがハロゲン、OCO(NR₃R₄)、S-C(NH₂)=NR₅であり、或いはm=1のときには隣接する窒素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃、R₄、及びR₅が独立にH又はアルキルであり; そしてXがH、OH、Cl、Br、I、F又はアルコキシである。請求の範囲第1項に記載の置換アントラキノン。

3. R₁及びR₂が独立に低級アルキルであり; m及びnが1であり; AがCl、Br、OCO(NR₃R₄)、S-C(NH₂)=NR₅であり、或いはm=1のとき

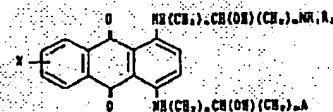
に隣接する窒素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃、R₄、及びR₅がHであり; そしてXがH又はOHである。請求の範囲第2項に記載の置換アントラキノン。

4. 請求の範囲第1項に記載の置換アントラキノンと、薬学的に受容し得る塩体又は希釈剤とからなる、プロテインキナーゼCを阻害するための医薬組成物。

5. 請求の範囲第2項に記載の置換アントラキノンと、薬学的に受容し得る塩体又は希釈剤とからなる、プロテインキナーゼCを阻害するための医薬組成物。

6. 請求の範囲第3項に記載の置換アントラキノンと、薬学的に受容し得る塩体又は希釈剤とからなる、プロテインキナーゼCを阻害するための医薬組成物。

7. プロテインキナーゼCと、阻害的量の以下の化学式を有する置換アントラキノンとを接触させることとからなる、プロテインキナーゼCを阻害する方法:



【式中、

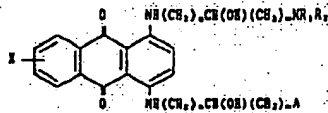
R₁及びR₂が独立にH、C₁-C₁₀アルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリールであり、又はR₁及びR₂は隣接する窒素原子Nと一緒になって置換又は非置換の環状基を形成し、この環はヘテロ原子を更に任意に含むことが得る; n及びmが独立に1、2、又は3であり; Aがハロゲン、OH、アルコキシ、OCO(NR₃R₄)、S-C(NH₂)=NR₅であり、或いはm=1のときには隣接する窒素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃、R₄、及びR₅が独立にH、アルキル、又はアリールであり; XがH、OH、NR₃R₄、Cl、Br、I、F、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、COOR₆、又はCO

NR₁, R₂であり; R₁, R₂, R₃, 及びR₄が独立にH, 低級アルキル, 又はアリールである。

8. R₁及びR₂が独立にH又は低級アルキルであり; n及びmが独立に1又は2であり; Aがハロゲン, OCO(NR₁R₂), S-C(NH₂)=NR₁であり、或いはm=1のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃, R₄, 及びR₅が独立にH又はアルキルであり; してXがH, OH, Cl, Br, I, F又はアルコキシである。請求の範囲第7項に記載の方法。

9. R₁及びR₂が独立に低級アルキルであり; n及びmが1であり; AがCl, Br, OCO(NR₁R₂), S-C(NH₂)=NR₁であり; 或いはm=1のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃, R₄, 及びR₅がHであり; してXがH又はOHである。請求の範囲第8項に記載の方法。

10. プロテインキナーゼCを阻害するための医薬の製造における、以下の化学式を有する化合物の使用:



【式中、

R₁及びR₂が独立にH, C₁-C₁₀アルキル, アリール, アリールアルキル, アルキルアリールであり、又はR₁及びR₂は隣接する酸素原子Nと一緒に環を形成又は非置換の環状基を形成し、この環はヘテロ原子を更に任意に含むことができ; n及びmが独立に1, 2, 又は3であり; Aがハロゲン, OH, アルコキシ, OCO(NR₁R₂), S-C(NH₂)=NR₁であり、或いはm=1のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃, R₄, 及びR₅が独立に

明細書

プロテインキナーゼCの

ビスー(ヒドロキシアルキルアミノ)-アントラキノン阻害剤

【技術分野】

本発明は、炎症性疾患及び心血管疾患の治療、並びに化学療法剤の分野に関する。更に特定すれば、本発明は酵素プロテインキナーゼCを阻害する、新規非対称性1,4-ビスー(アミノ-ヒドロキシアルキルアミノ)-アントラキノン環に関する。

【関連出願に関する言及】

本出願は、「プロテインキナーゼCのビスー(ヒドロキシアルキルアミノ)-アントラキノン阻害剤」の名称の下に、Jack B. Blais及びMary George Johnsonの名前で1990年11月5日に提出した米国出願Serial no. 07/609,252の一部継続出願であり、また米国出願は、1990年11月2日に提出した米国出願Serial no. 07/609,179の一部継続出願である。両出願はここにその全てを開示されたごとく、本出願に参照として包含される。

【従来技術】

プロテインキナーゼC(PKC)は、細胞の成長制御、調節、及び分化に重要な役割を果たす。カルシウム調節性でリン酸化依存性のセリン/トレオニン特異的プロテインキナーゼの属である。プロテインキナーゼCはまた、いくつかのクラスの腫瘍プロモーターと同時に内在性の細胞性ジアルグリセロールに対する主要な高親和性リセプターであるので、腫瘍発生の過程にも基本的に関与する。これらの腫瘍プロモーターはまたプロテインキナーゼC賦質作用を刺激する。Castagna et al. (1982) J.Biol.Chem. 257:7847 は、腫瘍促進性ホルモナルエステルによるプロテインキナーゼCの直接活性化を報告している。プロテインキナーゼCの作用メカニズムは、1989年3月28日にBiol.111に付された米国特許第4,816,450 (その開示はここにその全てを開示されたごとく、

H, アルキル, 又はアリールであり; XがH, OH, NR₁R₂, Cl, Br, I, F, アルキル, アリール, アルコキシ, アリールアルコキシ, COOR₁, 又はCONR₁R₂であり; してR₁, R₂, R₃, R₄, 及びR₅が独立にH, 低級アルキル, 又はアリールである。

11. 該化合物が請求の範囲第40項に記載の化学式【式中、R₁及びR₂が独立にH又は低級アルキルであり; n及びmが独立に1又は2であり; Aがハロゲン, OCO(NR₁R₂), S-C(NH₂)=NR₁であり、或いはm=1のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃, R₄, 及びR₅が独立にH又はアルキルであり; してXがH, OH, Cl, Br, I, F又はアルコキシである】を有する。請求の範囲第10項に記載の使用。

12. 該化合物が請求の範囲第40項に記載の化学式【式中、R₁及びR₂が独立に低級アルキルであり; n及びmが1であり; AがCl, Br, OCO(NR₁R₂), S-C(NH₂)=NR₁であり、或いはm=1のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し; R₃, R₄, 及びR₅がHであり; してXがH又はOHである】を有する。請求の範囲第11項に記載の使用。

13. 該化合物が該医薬中に治療的濃度で存在する。請求の範囲第10項に記載の使用。

本出願に包含される)に記載されている。プロテインキナーゼCは中性脂質であるジアルグリセロール(DAG)によって活性化され、活性化されると、高タンパク質上のセリン又はトレオニンへとRas/ATPのリン酸化を転移する。

プロテインキナーゼCの活性化は、ガン性腫瘍、炎症、及び再灌流損傷(reperfusion injury)を含むいくつかのヒトの疾患過程において暗示されてきたので、プロテインキナーゼCの阻害はこれらの症状を治療するうえで大きな治療価値を有するはずである。

プロテインキナーゼC阻害剤はin vitro及びin vivoの両方でレスアラチンの抗腫瘍活性を高めると報告されている(Grunstein et al. (1988) Adv.Lysine Acetyl. 28:201; 及びドイツ公開公報DE 3827974)。更に、プロテインキナーゼCは腫瘍成長におけるその中心的役割の故に、治療デザインの標的となる可能性があることが示唆されている(Tritton, T.R. and Blockman, J.A. Cancer Cells 2:85-102(1990))。

プロテインキナーゼC阻害剤は、血小小板の凝集と、血小小板活性因子(PAF)のような好中球活性剤の放出とを阻害することが示された(Schochtele et al. (1988) Biochem.Biophys.Res.Commun. 151:542; Kassar et al. (1987) J.Biol.Chem. 262:13820; Yanada et al. (1988) Biochem.Pharmacol. 37:1181)。プロテインキナーゼC阻害剤はまた、好中球活性化と酸化性代謝を阻害することが示され(Malietre et al. (1987) J.Biol.Chem. 262:15730; Lambeth et al. (1988) J.Biol.Chem. 263:3818; Pittot et al. (1987) J.Biol.Chem. 262:10072; 及び Gaudry et al. (1988) Immunology 63:715)。また好中球の炎症反応と、タンパク質分解酵素及び反応性酸素中間体の放出とを阻害することが示された(Nelson et al. (1988) J.Biol.Chem. 263:12628; Fujita et al., (1988) Biochem.Pharmacol. 35:4555; Berkow et al. (1987) J.Labour.Biol. 41:441; Selinger et al. (1987) Biochem.Biophys.Res.Commun. 148:747; Kraver et al. (1988) J.Biol.Chem. 263:5878; 及び David et al. (1989) Biochem.J. 264:879)。かくして、プロテインキナーゼCの阻害剤は、心筋の再灌流損傷と関連する病因

の最も重要なメカニズムの一つとして阻害でき、従って決定的な治療上の利点を有する。更に、角化細胞 (keratinocyte)、及び好中球における酸化バースト (oxidative burst) に対するプロテインキナーゼC阻害剤の阻害効果は抗炎症効果につながるであろう。

ガンの治療を含む、置換アントラキノンの各種の用途が報告されている。Moriyamaほかは1976年6月1日に付与された米国特許第3,960,751は、多色性染料として用い得る置換アントラキノンを開示する。Adamは1986年7月1日に付与された米国特許第4,598,155は染料として用い得るテトラゾール置換アントラキノンを開示する。

Stacheほかは1988年8月9日に付与された米国特許第4,762,648は、ポリセアター阻害作用を有する既知の置換アントラキノンとして、またポリマー置換における緩衝剤として用い得る一官能基性及び二官能基性アントラキノール (オキシ-2,3-オキシドプロパン) を開示する。この化合物はまた細胞増殖抑制活性も示す。

幾つかの特許が新生物の治療に置換アントラキノンを使用することを開示する。Krapchoほかは1990年1月16日に付与された米国特許第4,894,451は、新生物の治療に用い得る非対称性1,4-ビス-(アミノアルキルアミノ)-アントラセン-9,10-ジオンを開示する。Zee-Chengほかは1982年1月13日に付与された米国特許第4,310,666は、新生物の治療に用い得る1,4-ビス-(置換アミノアルキルアミノ)-アントラキノンを開示する。Murdochほかは1985年7月2日に付与された米国特許第4,926,989は、キレート剤として、また腫瘍の成長の阻害剤として用い得る、対称性1,4-ビス-(置換アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラキノンを開示する。Murdochほかは1980年4月8日に付与された米国特許第4,197,249はまた、キレート剤として、また腫瘍の成長の阻害剤として用い得る、対称性1,4-ビス-(置換アミノ)-5,8-ジヒドロキシアントラキノンを開示する。Murdochほかは1985年9月10日に付与

された米国特許第4,440,788は、キレート剤として、また白血病の進行阻害剤及び/又は哺乳動物における腫瘍成長の阻害剤として用い得る、1,4-ビス-[(アミノアルキル)アミノ]-9,10-アントラセンジオン、及びそのロイコ塩を開示する。1990年5月7日に付与された日本特許第19819は、単独で又はその他の抗腫瘍剤との組み合わせにおける抗腫瘍剤として用い得る、アントラキノン置換の5及び6位に置換基を有する、置換アントラキノンを開示する。

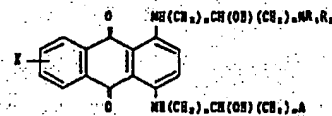
ドイツ公開公報DE 3827974 A1は、ガンの治療に用い得る、阻害、阻害類似体、細胞増殖抑制又はホスホリパーゼ阻害剤との組み合わせにおけるプロテインキナーゼC阻害剤からなる治療剤を開示する。しかしながら、この公報に開示されたプロテインキナーゼC阻害剤には置換アントラキノンは1つも含まれていない。

置換アントラキノンはガンの治療剤として報告されたことがあるが、ミトキサントロン (Mitoxantrone) のような置換アントラキノンは、主として免疫抑制活性や免疫毒性のような副作用を伴うことが知られている。従って、これらの欠点の一部又は全てを回避する新規ガン治療が求められている。

更に、炎症及び特に心臓の損傷に関連する再灌流損傷はよくある症状であるが、これらの症状に対する旺盛な研究と適切な治療が必要であるにもかかわらず、決定的な治療が全く存在しない。

【発明の開示】

本発明は、以下の化学式を有する新規な非対称性置換アントラキノンを提供する。



【式中、

R₁及びR₂は独立にH、C₁-C₁₀アルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリールであり、又はR₁及びR₂は隣接する置換原子Nと一緒に置換又は非置換の環状基を形成し、この環は酸素、窒素又は硫黄を含むヘテロ原子を更に任意に含むことができ、n及びmは独立に1、2、又は3であり、Aはハロゲン、OH、アルコキシ、OCO (NR₁R₂)、S-C (NH₂)-NR₁であり、或いはm=1のときには隣接する置換原子とともにオキシラン環を形成し、R₃、R₄、及びR₅は独立にH、アルキル、又はアリールであり、XはH、OH、NR₁R₂、C₁、Br、I、F、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、COOR₁、又はCONR₁R₂であり、そしてR₁、R₂、R₃、R₄、及びR₅は独立にH、低級アルキル、又はアリールである。

本発明の新規な化合物はプロテインキナーゼCの阻害に有用であり、また更にプロテインキナーゼCの阻害と関連する、或いはこれによって影響される症状、特にガン性腫瘍、炎症性疾患、心臓性再灌流損傷、及び再灌流損傷に関連する心臓機能障害の治療に有用である。プロテインキナーゼCの阻害は、細胞成長の阻害に繋がり、これによって抗腫瘍効果をもたらすことができる。更に、プロテインキナーゼCの阻害はまた、好中球における酸化バースト、血小板凝集、及び角化細胞の増殖の阻害に繋がり、これによって炎症効果も達成される。血小板凝集、好中球活性化、及び好中球放出に対する本発明の化合物の阻害活性は、再灌流損傷、特に心臓性再灌流損傷の治療にこれが有用であることを示している。

本発明の化合物は、その他の化学療法剤を用いる治療に併用である腫瘍の治療に特に有用であることが期待される。望むべきことに、本発明の化合物は、アドリアマイシンやミトキサントロンに耐性な細胞においてもプロテインキナーゼCを阻害することができ、それ故これらの化学療法剤と交差耐性でない。

これは本発明の化合物を腫瘍の治療に投与する場合に、起こり得る有害な副作用を少なくするために必要なことであるが、本発明の化合物は低濃度 (1 mM以

下) で腫瘍細胞の増殖を阻害することができる。

本発明の化合物はcAMP依存性のプロテインキナーゼCには影響を及ぼさないようであり、従ってcAMPによるプロテインキナーゼCの刺激と関連する代謝経路には何ら影響を及ぼさない。

本発明は付属の請求の範囲によってより特定して定義され、以下に記載する付ましい図面において詳述される。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の化合物の合成に用いる反応式Iの合成経路を示す。

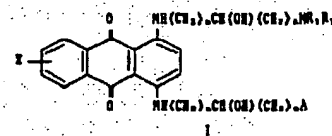
図2は、本発明の化合物の合成に用いる反応式IIの合成経路を示す。

図3は、本発明の化合物の合成に用いる反応式IIIの合成経路を示す。

図4は、対照及び化合物1を用いて治療したマウスのMCF-7腫瘍の平均重量と、腫瘍形成後の日数との関係を示すグラフを示す。対照マウスの腫瘍の大きさは最大で示し、試験マウスの腫瘍の成長は図4角で示す。

【発明の詳細な説明】

本発明は、以下の化学式Iを有する新規な置換アントラキノンを提供する。



【式中、

R₁及びR₂は各々独立にH、C₁-C₁₀アルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリールであり、又はR₁及びR₂は隣接する置換原子Nと一緒に置換又は非置換の環状基を形成し、より好ましくはH、又は低級アルキルであり、最も好ましくは低級アルキルである。m及びnは各々独立に1、

2、又は3であり、より好ましくは1又は2であり、最も好ましくは1である。
Aは好ましくはハロゲン、OH、アルコキシ、 $\text{OCO}(\text{NR}_1\text{R}_2)$ 、 $\text{SC}(\text{NH}_2)$ 、 NR_1 であり、或いは $m=1$ のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し；より好ましくはハロゲン、 $\text{OCO}(\text{NR}_1\text{R}_2)$ 、 $\text{SC}(\text{NH}_2)$ 、 NR_1 であり、或いは $m=1$ のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成し；最も好ましくはC1、Br、 $\text{OCO}(\text{NR}_1\text{R}_2)$ 、 $\text{SC}(\text{NH}_2)$ 、 NR_1 であり、或いは $m=1$ のときには隣接する酸素原子とともにオキシラン環を形成する。ハロゲンはここでは、フッ素、塩素、臭素、及びヨウ素を含む。
 R_1 、 R_2 、及び R_3 は好ましくは独立にH、アルキル、又はアリールであり；より好ましくはH又はアルキルであり；最も好ましくはHである。Xは好ましくはH、OH、 NR_1R_2 、C1、Br、I、F、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、 COOR 、又は CONR_1R_2 であり；より好ましくはH、OH、C1、Br、I、F、又はアルコキシであり；最も好ましくはH又はOHである。 R_1 、 R_2 、 R_3 、及び R_4 は独立にH、低級アルキル、又はアリールである。ここでは、低級アルキルの例はC-1、アルキルを意味する。
ここでは、アルキル置換基は直置、分枝鎖、及び環状基を含む、好ましくは直置鎖である。飽和置換基は、いくつかの置換基においては不飽和部分も有用である。アルキル置換基は好ましくはそれぞれ有用と信じられるメチル、エチル、及びプロピル置換基を有する置換ベンゼン基である。複数の置換基も同様に有用である。アリール置換基は好ましくはベンジル、フェニルエチル、フェニルプロピルなどを含むベンゼン置換アルカンである。

本発明の化合物はプロテインキナーゼCの阻害と関連する、或いはこれによって影響される症状、特にガン性腫瘍、炎症性疾患、再灌流損傷、及び再灌流損傷に関連する心臓血管障害の治療に有用である。従って、本発明の他の面は、プロテインキナーゼCと、阻害的量的の本発明の置換アントラキノン化合物とを接触させることからなる。プロテインキナーゼCの阻害法及び医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、本発明の置換アントラキノン化合物と、医薬的に受容し

得る媒体又は希釈剤とからなる。

本発明はまた、肝中球と、プロテインキナーゼC阻害的量的の本発明の置換アントラキノン化合物とを接触させることからなる。或いは肝中球と、酸化剤のバーストを阻害するのに有効な量的の本発明の化合物とを接触させることからなる。肝中球における酸化剤バーストを阻害する方法を提供する。

本発明は更に、炎症に結びつく腫瘍細胞に、プロテインキナーゼC阻害的量的の本発明の置換アントラキノン化合物を投与することからなる。或いは該腫瘍細胞に炎症を阻害するのに有効な量的の本発明の化合物を投与することからなる。炎症治療方法を提供する。

本発明は更に、哺乳動物腫瘍細胞と、プロテインキナーゼC阻害的量的の本発明の置換アントラキノン化合物とを接触させることからなる。或いは腫瘍細胞と、腫瘍細胞の成長を阻害するのに有効な量的の本発明の化合物とを接触させることからなる。哺乳動物腫瘍細胞の成長を阻害する方法を提供する。

本発明のさらなる態様は、腫瘍を有する哺乳動物に、プロテインキナーゼC阻害的量的の本発明の置換アントラキノン化合物を投与することからなる。或いは腫瘍を有する哺乳動物に、腫瘍の成長を阻害するのに有効な量的の本発明の化合物を投与することからなる。哺乳動物の腫瘍を治療する方法を提供する。

本発明の他の態様は、哺乳動物肉化細胞に、プロテインキナーゼC阻害的量的の本発明の化合物を投与することからなる。或いは肉化細胞に、肉化細胞の増殖を阻害するのに有効な量的の本発明の化合物を投与することからなる。哺乳動物肉化細胞の増殖を阻害する方法を提供する。

本発明の更に他の態様は、プロテインキナーゼCを阻害する医薬の製造における本発明の置換アントラキノン化合物の使用を提供する。本発明の化合物は好ましくは、該医薬中で治療的に有効な量で存在する。

置くべきことに、本発明の化合物はアドリアマイシン（抗生物質由来の化学療法剤である塩酸ドキソソルビン、Adria Laboratories社、Dublin, Ohio）、又はミトキサントロン（合成アントラセンジオン化

療法剤であるノバントロン、Lederle Laboratories, Pearl River, New York）と文脈特性でなく、これらの既知の化学療法剤に耐性な腫瘍細胞の成長を減少するのに有効であり続ける。アドリアマイシン又はミトキサントロンと文脈特性がないことは、本発明の化合物がアドリアマイシン又はミトキサントロン耐性な腫瘍の治療に特に有用であることを示唆している。

ガンは制御不能な細胞成長によって部分的に特徴付けられる疾患である。プロテインキナーゼCは細胞成長の制御に直接関与し、腫瘍形成に関与すると信じられている。プロテインキナーゼCは、非常に強力な腫瘍プロモーターであるホルボールエステルの、強制的でなくとも主要な、細胞内シグナルである。ホルボールエステル及びその他の腫瘍プロモーターはプロテインキナーゼCと結合してこれを活性化する。ジアルシグモロール(DAG)とホルボールエステルとは同じ部位で相互作用するので、アヘン酸リセプター（ここでは高親和性リセプターの保持が内在性類似体の存在を意味する）との類似から、DAGは“内在性ホルボールエステル”であることが示唆されてきた。DAGはプロテインキナーゼCのCα¹及びリン脂質に対する親和性を増加し、そしてこれらの本質的調節子の細胞レベルでプロテインキナーゼCを活性化することが示されてきた。ホルモン、成長因子、及び神経伝達物質を含む細胞外シグナルは、ホスファチジルイノシトール代謝経路を刺激して、IP₃及びDAGの生成をもたらすことが知られている。ウィルス及び腫瘍由来の40種の異なるガン遺伝子の遺伝子研究によって、ガン遺伝子は正常な細胞タンパク質の発現したものをコードすることが明らかとなった。いくつかのガン遺伝子は成長因子又はトランスメンブリンシグナルに含まれるその他の要素に関連すると思われる。これらのガン遺伝子産物は、決定的な第2のメッセンジャーのレベルを変化させることによって機能するように思われる。ガン遺伝子c-myc、c-jun、c-fos、bcl-1、及びsrcで形質転換された細胞は、高いDAGレベルを含んでいることが示され、次いでこれがプロテインキナーゼCを活性化すると信じられている。確かにc-myc形質転換細胞につ

いての研究は、DAGの上昇に付随するプロテインキナーゼCの活性化を示した。

ホルボールミリスチートアセート(PMA)のようなホルボールエステルは、腫瘍細胞、マイトジェネシス、分化、及び遺伝子発現に対する影響を含む複雑な影響を細胞に及ぼす。合成ジアルシグモロールは、in vitroでPMAの多くの影響を模倣し、プロテインキナーゼCの阻害剤は細胞に対するPMA誘発性の影響を阻害することが示された。かくして、プロテインキナーゼCは、DAGの細胞内での増加、及びこれに付随するプロテインキナーゼCの増加を引き起こす。c-mycなどのある種のガン遺伝子の活動を仲介するのかもしれない。更に、プロテインキナーゼCの活性化は、細胞トランスフォーメーションにおいて重要な役割のガン遺伝子である、c-myc、c-jun、c-fos、c-mycの発現を導く。NIH 3T3細胞におけるプロテインキナーゼCの過発現(overexpression)は、成長制御の変化、及び腫瘍化増強を引き起こし、またラット胎盤芽腫では軟肉中での足場非依存性成長をもたらす。これらの実験において、これらの細胞におけるプロテインキナーゼCの過発現は、移植細胞を受け取った動物中に腫瘍形成をもたらした。

幾つかの研究は、乳及び肺ガン腫瘍のようなある種の腫瘍タイプにおいてはプロテインキナーゼCの発現が増加していることを示した。ヒト結腸ガン腫瘍においても、遺伝子レベルでの発現増加は観察されなかったが、活性化されたプロテインキナーゼCが検出されている。腫瘍に対する基質としてプロテインキナーゼCによってトポイソメラーゼが直接調節されており、プロテインキナーゼC阻害剤はレスアラチンのような化学療法剤の作用を増強することが示されている。

プロテインキナーゼCの阻害剤として特異的に特定される、新規でより強力な化合物は、動物モデルにおける腫瘍成長を阻害する化学療法剤となることが約束されている。

動物実験による研究によると、血行性閉塞の心性性閉塞のうちの約50%又はそれ以上が、閉塞(occlusion)部位に蓄積する多形核白血球(好中球)

によるものである。善くして好中球による損傷は、活性化した好中球からのタンパク質分解酵素の放出、又は反応性酸素中間体(ROI)の放出によるものであるかも知れない。心筋性虚血に関連する“再び流れない(n o. r e f l o w)”現象の多くは、心筋性毛細血管の閉塞によるものである。毛細血管の閉塞は、血小板の凝集と好中球の凝集の双方によるものである。いずれの細胞タイプも虚血の起きる間に凝集するけれども、それぞれの毛細血管の閉塞に対する相対的な寄与はまだ確立していない。心筋梗塞への好中球による損傷はカスケード反応で進行することはよく知られているが、その最初の出来事の中の1つは、活性化された好中球が損傷した血管内皮に結合することである。しかしながら、この好中球の結合はその活性化によって有意に増強され、これよりもまだ早いかも知れない出来事が、活性化細胞として機能し得る分子(サイトカイン類、及び定化性因子など)の生成である。これらの分子はおそらく、傷付いた血管系から、あるいは内皮由来の酸化剤による血腫タンパク質又は脂質の酸化から由来する。

反応性酸素中間体の有害な効果を克服するための戦略は、該分子のたりのスカベンジャーの開発に焦点を合わせてきた。スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)はスーパーオキシドの特に有害なスカベンジャーであることが示されてきたが、血漿中での非常に低い半減期という欠点に悩まされてきた。いくつかの会社が、リボソームカプセル化又はポリエチレングリコール複合体のような手法によって長い半減期をもつこの酵素の変異体を作製することによってこの問題に臨んできた。これらの新しい変異体の有効性についての報告が入り交じっている。過酸化水素のスカベンジャーであるカタラーゼ、及び水酸化ラジカルスカベンジャーも試験され、いろいろな程度で有効であることが見いだされた。しかし、反応性酸素中間体をスカベンジするために考えられたいずれの戦略も、血小板の凝集、定化性分子の放出、好中球の活性化及び血管内皮への付着、又は活性化好中球からのタンパク質分解酵素の放出を防止することはできないであろう。

再血液循環のための治療剤としてのプロテインキナーゼCの利点は、これが1)

血小板凝集とP A Tのような好中球活性化剤の放出をブロックする、2) 好中球の活性化、定化性移動、及び活性化された又は損傷した内皮への付着をブロックする、そして3) タンパク質分解酵素及び反応性酸素中間体の好中球放出をブロックする、ことが示された点にある。従って、これらの治療剤は再血液循環に関連する利点の最も重要な3つのメカニズム全てをブロックすることができ、従って明確な治療利点を有する。

本発明の化合物は、図1、2、及び3にそれぞれ示す反応式I、II、及びIIIの方法で製造される。当分野で公知のその他の合成経路もまた用い得る。ここで用いる場合には、アントラキノン環構造は、メルクインデックス(第10版)、M e r c k & C o., I n c. R a t h w a y, N e w J e r s e y, 1 9 8 3, p p 1 0 0 - 1 0 1 に表示される慣用的環の番号付けに従う。

Aがハロゲン又は保護する酸素原子とオキシラン環を形成する場合には、本発明の化合物は図1に示す反応式Iの方法に従って製造できる。反応式Iにおいては、ジアミノアントラキノリ-1とエビハロヒドリ-2との反応は、ビス(3-ハロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-アントラキノリ-2を生成し、これを適量から選択した溶媒の沸点までの温度で、ジエチルアミンのようなアミンで処理すると、生成物1aを生成する。エポキシド類似体1bは、1aを水酸化ナトリウムのような塩基で処理することにより得た。図2の反応式IIに示す別法では、ビス-ハロヒドリン中間体2を、塩基処理を介してビス-エポキシド3に実施して、次いで3をアミンと反応させて1bを生成する。反応式I及びIIによって製造できる化合物の例を表1及び2に列挙する。

Aがハロゲン又は保護する酸素とオキシラン環を形成する以外の官能基である場合には、表1に列挙する本発明の化合物は図3に示す反応式IIIによって製造できる。例えば、図3に示すように、反応式Iからの化合物1aを、ハロ化合物からヒドロキシ化合物1cへと交換する。次いで、K o s o v s k y e t a l., (1986) T e t r a h e d r o n L e t t e r s 2 7 : 5 5 2 1 (その記載はここに全てが開示されたごとく、参照として本明細書に含まれる)に記載の方法を用いて、該ヒドロキシ化合物1cの化

学式(式中、Aはアルコキシ、OCO(NR₁R₂)、又はSC(NH₂)=NR₃である)を有する化合物の合成に用いる。本発明の化合物の合成には当分野で公知のその他の方法もまた用いることができる。

本発明の化合物の光学活性なエナンチオマーは、市販のグリンドール又はエビクロロヒドリンのような光学活性な出発物質を用いて、反応式I及びIIによって製造できる。

本発明の化合物の高平的に受容し得る薬もまた本発明の方法において有用である。本発明で有用な薬学的に受容し得る薬は、塩酸、乳酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、コハク酸、パモ酸(p a m o i c a c i d)、琥珀酸及びリン酸の塩を含む。

表1

化合物	R ¹	R ²	X	A	n	m	融点(°C)
1a-1	Et	Et	H	Cl	1	1	100-105(塩酸塩)
1a-2	H	Pr	H	Cl	1	1	87g
1a-3	H	CH ₂ Ph	H	Cl	1	1	87g
1a-4	Octyl	Octyl	5-Cl	Br			
1a-5	Et	Ph	8-Ph-O	I	2	2	
1a-6	Et	Et	H	OH	1	1	87g
1d-1	Et	Et	H	OCN ₂	1	1	
1d-2	Me	Et	7-HO	O-(n-Bu)	2	2	
1e-1	Et	Et	H	OCH ₃	1	1	
1e-2	Me	Me	8-Br	OCH ₂ Pr ₂	1	2	
1f-1	Et	Et	H	SC(NH ₂)=NH ₂	1	1	
1f-2	n-Bu	n-Bu	F	SC(NH ₂)=NH ₂	2	2	
1f-3	n-Bu	Me	5-COOH	C(NH ₂)=NH ₂	1	2	

表2

化合物	R ¹	R ²	X	n	m	融点(°C)
1b-1	Et	Et	H	1	1	98(d)
1b-2	H	Pr	H	1	1	
1b-3	n-Bu	n-Bu	5-HO	2	1	
1b-4	Pr	Me	5-Br	2	2	
1b-5	H	H	7-COOH	2	2	
1b-6	Me	Me	8-HO	1	1	
1b-7	n-Bu	Me	8-HNO ₂	1	1	

本発明の化合物は、活性成分と哺乳動物の体内における治療剤の作用部位との接触をもたらすいかなる方法によっても投与でき、経口、静脈内、及び腹腔内投与を含むが、これに限定されるものではない。本発明の化合物は、単独で、或いは本発明の他の化合物、化学療法化合物のような他の医薬化合物、又は放射線治療のような他の治療と組み合わせて投与できる。化合物は好ましくは選択された投与経路、及び標準的医薬処方に基づいて選択された薬学的に受容し得る剤形とともに投与される。

本発明の化合物は、プロテインキナーゼCの阻害、或いは癌細胞増殖の阻害、腫瘍の転移の阻害、角化細胞増殖の阻害、好中球からの酸化バーストの阻害、又は血小板凝集の阻害に有効である治療的に有効な薬又は組成物で、哺乳動物、好ましくはヒトに投与する。いかなる特定の場においても投与量は、本発明の特定の化合物の薬力学的性質、及びその投与形態と経路、投与される者の年齢、健康状態、及び体重、症状の性質と程度、現在受けている治療の性質、治療の程度、及び所望する効果、などの各要因に依存する。化合物の1日の投与量は、体重

1 kg当たりの5から約100 mg、好ましくは体重1 kg当たりの10から約200 mg、そしてより好ましくは体重1 kg当たりの10から約500 mgであり、好ましくは1日2から4回に分けて投与するか、或いは持続的放出形態で投与することが企図される。

本発明の化合物は、カプセル、錠剤、及び錠剤のような固形の単位投与形態、或いはエリキシル、シロップ、及び懸濁液のような液体の単位投与形態における経口医薬として投与される。

本発明の化合物は、医薬製造の分野での標準法に従って、単位投与量に医薬として使用すべく製剤される。この分野における標準的参考文献であるRemington, Pharmaceutical Sciences, A.Oscl. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania を参照されたい。

例えば、本発明の化合物は、セラチンカプセルに押入するため、或いは錠剤に成型するために、ラクトース、スクロース、マンニトール、ステアチン、セルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、及びステアリン酸のような粉末状体と混合される。錠剤カプセルも長時間にわたって医薬を連続的に放出するための持続的放出製剤として製造できる。圧縮された錠剤は、いかなる好ましくない味もマスクし、また空気を錠剤を保護するために砂糖でコーティングするか、又はフィルムコーティングでき、或いは胃腸管で選択的に分解されるように調製される。

経口投与のための液体投与形態は、水、パフアー、又は食塩水のような医薬的に受容し得る希釈剤に加えて、患者に受け入れられやすくするために、着色剤や香料を含んでいてもよい。

非経口投与のためには、本発明の化合物は、水、オイル、食塩水、水性デキストロス（グルコース）、及び関連の輸液、及びアロピレングリコール又はポリエチレングリコールのようなグリコール類などの適当な液体又は希釈剤と混合できる。非経口投与のための溶液は、好ましくは本発明の化合物の水溶性塩を含む。安定化剤、抗酸化剤、及び保存料も加えてよい。適当な抗酸化剤は、重亜塩

酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、アスコルビン酸、クエン酸とその塩、及びEDTAナトリウムを含む。適当な保存料は、ベンズアルコニウムクロリド、メチル又はプロピルパラベン、及びクロロブタノールを含む。

実施例

以下に記載するのは、本発明を例示するための特定の例であって、本発明の範囲を限定するためになされるものではない。

実施例1: 1, 4-ビス-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン

水溶液(200 mL)中の1, 4-ジアミノアントラキノ(Aldrich Chemical Company, Milwaukee, Wisconsin) (10 g, 42 mmol)の溶液に、室温でエピクロロヒドリン(84.5 mL, 1.08 mol)を加えた。溶液を90°Cで30分間攪拌し、溶液を減圧で除去した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, CH₂Cl₂: MeOH/25:1)で精製し、CH₂Cl₂-エーテル-ヘキサンから再結晶すると、何れも黄色固体の塩化化合物(12.46 g, 70%)を得た。融点: 167-169°C:

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.21(ddd, 2H, CH), 3.5-3.6(m, 8H, CH₂), 3.75(d, J=3.2, 4H, CH), 4.19(ddd, 2H, NH), 7.02(d, J=3.2, 2H, ArH(2,3)), 7.69(m, 2H, ArH(6,7)), 8.27(m, 2H, ArH(5,8)).

元素分析: C₁₄H₁₀O₂N₂Cl₂ · x H₂Oとして計算値: C, 56.15; H, 4.83; N, 6.55 実測値: C, 56.18; H, 4.76; N, 6.29

実施例2: 1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン (表1の化合物1a-1)

実施例1の化合物、即ち反応式I及びIIの化合物2である1, 4-ビス-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン(1

2.88 g, 30.43 mmol)のエタノール(200 mL)溶液に、微量酸素気下で、1.5時間かけてジエチルアミン(3.15 mL, 60.86 mmol)を滴下して加えた。溶液を48時間攪拌し、溶液を減圧で除去した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, CH₂Cl₂: MeOH/25:1)で精製し、CH₂Cl₂-エーテル-ヘキサンから再結晶すると、表1の化合物1a-1である、黄色固体の塩化化合物、1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン(8.1 g, 60%)を得た。融点: 165°C:

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.10(t, J=7.8, 8H, CH₃), 2.63(m, 4H, CH₂), 2.74(m, 2H, CH₂), 3.44(m, 2H, CH₂), 3.56(m, 1H, CH), 3.63(m, 1H, CH), 3.73(m, 2H, CH₂), 4.17(ddd, 1H, NH), 4.19(ddd, 1H, NH), 7.22(d, J=3.2, 2H, ArH(2,3)), 7.69(m, 2H, ArH(6,7)), 8.3(m, 2H, ArH(5,8)).

元素分析: C₂₄H₂₆O₂N₂Cl₂ · 1.25 H₂Oとして計算値: C, 59.74; H, 6.69; N, 8.71 実測値: C, 59.50; H, 6.27; N, 8.50

実施例3: 1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン塩酸塩 (表1の化合物1a-1)

アセトニトリロクロロメタン(50%)中の1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン(0.531 g, 2.36 mmol)溶液に、濃塩酸(8滴)をゆっくりと加えた。黄から赤への色の変化が観察された。溶液により固体が得られた。融点: 106-108°C (極めて低融性)。

¹H NMR (D₂O) δ 1.44(t, J=7.8, 8H, CH₃), 2.80(m, 4H, CH₂), 3.29(m, 4H, CH₂), 3.28(m, 2H, CH₂), 3.73(m, 2H, CH₂), 3.92(ddd, 1H, NH), 4.15(ddd, 1H, NH), 6.23(m, 2H, ArH(2,3)), 7.25(m, 2H, ArH(6,7)), 7.82(m, 2H, ArH(5,8)).

元素分析: C₂₄H₂₆O₂N₂Cl₂ · 1.5 H₂Oとして計算値: C, 51.48; H, 6.90; N, 7.50 実測値: C, 51.70; H, 6.35; N, 7.41

実施例4: 1, 4-ビス-(2, 3-エポキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン

MeOH(500 mL)中の実施例1の化合物である1, 4-ビス-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン(8.3 g, 19.8 mmol)の溶液に、60°Cで水酸化ナトリウム(3.5 g)を加えた。得られる黄色溶液を室温で4時間攪拌し、溶液を減圧で除去した。残渣を減圧で除去してフラッシュカラムクロマトグラフィー(シリカゲル, CH₂Cl₂: MeOH/25:1)で精製した。CH₂Cl₂-ヘキサンから再結晶して、反応式2の化合物2である塩化化合物、1, 4-ビス-(2, 3-エポキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン(6.2 g, 89.37%)を得た。融点: 189-190°C:

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.74(m, 1H, CH₂), 2.87(m, 1H, CH₂), 3.28(m, 1H, CH), 3.57(m, 1H, CH₂), 3.78(m, 1H, CH₂), 7.22(d, J=3.2, 2H, ArH(2,3)), 7.71(ddd, J=3.2, 2H, ArH(6,7)), 8.34(ddd, J=3.2, 2H, ArH(5,8)), 10.78(m, 2H, NH).

元素分析: C₁₄H₁₀O₂N₂ · x H₂Oとして計算値: C, 67.66; H, 5.25; N, 7.93 実測値: C, 67.72; H, 5.55; N, 7.54 IR: 3400, 3070, 2910, 1640, 1220, 900

実施例5: 1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(2, 3-エポキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン (表1の化合物1b-1)

メタノール中の実施例3の化合物である、1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(3-クロロ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-9, 10-アントラセンジオン塩酸塩(1 g, 1.78 mmol)の溶液に、水酸化カリウム(0.3 g, 3.6 mmol)を加えた。混合物を室温で48時間

攪拌した。溶液を減圧下で濃縮し、残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、10:1までの比率でのクロロホルムとメタノールグラジエント）で精製すると、表1の化合物1b-1である置換化合物、1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(2,3-エポキシプロピルアミノ)-9,10-アントラセンジオン(391mg, 5.2%)を得た。融点: 98°C;

^1H NMR (CDCl₃): δ 1.05 (t, J=7.1Hz, 6H, CH₃), 2.52 (m, 7H, CH₂), 2.57 (m, 1H, CH₂), 3.27 (m, 1H, CH₂), 3.43 (m, 2H, CH₂), 3.59 (m, 1H, CH₂), 3.77 (m, 1H, CH), 5.85 (m, 1H, CH), 7.55 (s, 2H, Ar(2,3)), 7.71 (s, 2H, Ar(6,7)), 8.35 (s, 2H, Ar(5,8)), 10.80 (b, 1H, NH), 10.92 (b, 1H, NH);

元素分析: C₂₄H₂₈N₄O₂として計算値: C, 68.1; H, 6.90; N, 9.92 実測値: C, 67.86; H, 6.96; N, 9.85

実施例6: 1-(3-ジエチル-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(2,3-ジヒドロキシプロピルアミノ)-9,10-アントラセンジオン塩酸塩(表1の化合物1c-1の塩酸塩)

メタノール-水(1:1, 20mL)中の実施例5の化合物である、1-(3-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(2,3-エポキシプロピルアミノ)-9,10-アントラセンジオン(120mg, 0.28mmol)の溶液に、パラートルエンスルホン酸(272mg, 1.43mmol)を加えた。混合物を室温で16時間攪拌した。溶液を減圧下に除去して、残渣をクロロホルム-水で処理した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥して、溶液を除去した後、残渣をカラムクロマトグラフィー（シリカゲル、CH₂Cl₂と段階的に増加するメタノールグラジエント）で精製すると、生成物を濃縮溶媒として得た。濃縮溶媒のメタノール溶液に、色の変化が観察されるまで塩化水素ガスを通した。次いで置換化合物1-(3-ジエチル-2-ヒドロキシプロピルアミノ)-4-(2,3-ジヒドロキシプロピルアミノ)-9,10-アントラセンジオン塩酸塩を昇温で乾燥すると、極めて吸湿性であった。

^1H NMR (CDCl₃): δ 1.05 (t, J=7.1Hz, 6H, CH₃), 2.72-2.55 (m, 6H, CH₂), 3.19 (m, 4H, CH₂), 3.31 (s, 3H, OH), 3.81 (m, 2H, CH), 3.87 (b, 1H, OH), 3.92 (m, 2H, CH₂), 4.11 (b, 1H, OH), 6.05 (m, 2H, Ar(2,3)), 7.52 (m, 2H, Ar(6,7)), 8.08 (m, 2H, Ar(5,8)), 10.73 (m, 2H, NH);

実施例7: プロテインキナーゼC阻害

プロテインキナーゼC (PKC) のアッセイは、プロテインキナーゼCが低活性するのに必要な n v1v0 状態を複製するようにデザインされる。従って、pH、温度及び補因子濃度は生理学的レベルと同等である。ヒストンH1（高リン型）は容易に入手でき、またプロテインキナーゼCの優れた基質として作用するので、これをホスホリル化アクセプタータンパク質としてアッセイに用いる。酵素はラット肝臓から調製し、無塩SDS-ポリアクリルアミドで単一バンドと特定される程度の純度まで精製する。リン酸、DAG、及びCa²⁺によるプロテインキナーゼCの調節メカニズムについての研究は、酵素補因子の物理的性質によって阻まれてきた。スクリーニングアッセイにおいては、ホスファチジルセリン (PS) 及びDAGを同時に添加して、単一メタ及び多量メタラ小胞を形成させる。阻害剤のアッセイの検出感を最大にするために、アッセイにおける阻害剤の濃度は最適以下にする。可能性のある阻害剤化合物を、最終阻害剤濃度がそれぞれ4, 3, 4.3及び21.8 μ Mとなるように、3つの濃度でジメチルスルホキシド中でアッセイに加える。酵素の添加でアッセイを開始し、10分後に2.5%トリクロロ酢酸 (TCA) と1.0mg/mLのウレシ血球アルブミン (BSA) とを加えることによってアッセイを停止する。放射性ヒストン産物を洗浄し、ガラス繊維フィルター上で洗浄して未反応³²P-ATPを通過させる。ホスホリル化量はシンチレーションカウンタで測定した放射能活性によって決定する。酵素の存在しないバックグラウンドの活性、阻害剤の存在しない活性、及び活性阻害剤の飽和レベルでの最大酵素活性を測定するために、各アッセイには対照を含める。アッセイ成分及び濃度を表3に示す。

アッセイ成分	表3 濃度
Hepes pH7.5	20mM
MgCl ₂	20mM
CaCl ₂	100 μ M
EGTA	95 μ M
ヒストン H1	200 μ g/mL
ホスファチジルセリン	40 μ g/mL
ジアシルグリセロール	1.8 μ g/mL
プロテインキナーゼC	0.6 μ g/mL
γ - ³² P-ATP	20 μ M

プロテインキナーゼCアッセイの結果は、表4のプロテインキナーゼCと記載された表に示してある。結果はIC₅₀で示し、これは対照におけるプロテインキナーゼC活性のレベルと比較して、プロテインキナーゼC活性を50%阻害するのに必要な試験化合物の濃度を表す。表4に示すように、試験化合物のうちの1つを除く全てが200 μ M以下の濃度でプロテインキナーゼC活性の50%を阻害することができた。化合物1b-1(塩基)が110 μ Mという最も低いIC₅₀を有し、一方化合物1a-1(塩酸塩)が230 μ Mという試験化合物のうちでは最も高いIC₅₀を示した。

表4		
IC ₅₀ (μ M)		
試験	PKC	PKA
1a-1 (塩基)	180	n. e.
1a-1 (塩酸塩)	230	n. e.
1a-2 (塩酸塩)	160	n. e.

1a-3 (塩酸塩)	110	n. e.
1c-1 (塩酸塩)	180	n. e.
1b-1 (塩基)	110	n. e.

(表4では、n. e. は影響無しを表す)

実施例8: cAMP依存性プロテインキナーゼC (PKA) アッセイ

プロテインキナーゼCの阻害剤であることが見いだされた化合物を用いて、cAMP依存性プロテインキナーゼC (PKA) に対する阻害活性も試験した。この酵素はプロテインキナーゼCと同様に、細胞-細胞間のコミュニケーションに重要な役割を果たし、第2のメッセンジャーであるcAMPによって活性化される。本発明の化合物の選択性を確認するためには、PKAに対する第2のスクリーニングは有用である。標準的アッセイ条件を表5に示してある。ジメチルスルホキシド (DMSO) 中の阻害剤を加える前に、PKA (Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri) の触媒サブユニットをバッファーと混合する。³²P-ATPを加えることによってアッセイを開始し、2.5%トリクロロ酢酸 (TCA) と1.0mg/mLのウレシ血球アルブミン (BSA) によって停止するまで、10分間反応させる。ホスホリル化タンパク質を沈澱によって分離して、ベータシンチレーションカウンタ中で放射能活性を測定する。

アッセイ化合物	表5 濃度
Hepes pH7.5	20mM
ヒストン	200 μ g/mL
ジチオスレイトール	32 μ g/mL
プロテインキナーゼ	2.6 μ g/mL
γ - ³² P-ATP	20 μ M

PKAアッセイの結果は、表4（実施例7）のPKAと対応した例に示す。表4に示すように、試験した本発明の化合物はPKAに対して何ら影響を及ぼさなかった。本発明の試験化合物は、プロテインキナーゼCに選択的であり、cAMP依存性プロテインキナーゼには何ら影響を及ぼさない。従って、本発明の化合物はcAMPによるプロテインキナーゼの刺激と関連する代謝経路には何ら影響を及ぼさない。

実施例9：ヒト腫瘍成長の阻害

ヒト肺癌細胞系MCF-7、及びMCF-7細胞のアドリアマイシン耐性系であるMCF-7/ADRをナショナルキャンサーインスティテュート、Frederick, Marylandから得た。ヒト骨髄腫細胞系8226、8226細胞のミトキサントロン耐性系である8226/MT、及び8226細胞のアドリアマイシン耐性系である8226/ADRをDr. Bill Dalton, Arizona Cancer Center, Tucson, Arizonaから得た。

ヒト腫瘍細胞をトリプレチン処理（0.05%トリプレチン、GIBCO）して、血球計数器でカウントし、96ウェルのマイクロタイタープレートに10,000細胞/ウェルの濃度で接種する。一次細胞を表面に固着させた後、増殖を吸引して、新鮮な培地100μlで置き換える。2x最終濃度の用量応答を決定するために、試験物質を希釈し、4重試験において100μl/ウェルに加えて、各ウェル当たり200μlの全容量となるようにする。次いでマイクロタイタープレートを用いて、5%CO₂で一夜（18-24時間）インキュベーションし、次に50μlの培地中、0.5%CO₂/ウェルの濃度でH-チミジンを加える。上と同じ条件下でプレートを再び4時間インキュベーションする。次いで上清を吸引して、各ウェルに50μlトリプシン（0.05%、GIBCO社）を加える。細胞が表面から離れているを確認するために、顕微鏡でチェックし、セルハ

ーベスター（PHD, Cambridge Technology, Inc.）でプレートを読み取る。ウェルに対応するフィルターペーパーをセンチレーションパイアルに入れて、細胞によって取り込まれた³H-チミジンの量を測定する。IC₅₀を決定するために、増殖のみの細胞ウェルからなるポジティブコントロールと試験物質の応答とを比較する。IC₅₀とは、試験物質にさらされていない増殖細胞への³H-チミジンの取り込みの50%を阻害するのに必要な試験化合物の濃度である。³H-チミジンの取り込み実験は、細胞代謝を測定する標準試験である。結果に増殖する細胞は³H-チミジンを取り込み、一方増殖していない細胞ははるかに低い速度で³H-チミジンを取り込むか、成りには全く取り込まない。従って、³H-チミジンの取り込みを阻害する試験物質は、細胞の成長を遅らせる。

これらの試験結果は表6及び7に示す。表6に示すように、化合物1a-1及び1b-1のいずれも1μM以下の濃度で（それぞれIC₅₀=0.25μM及び0.025μM）³H-チミジン取り込みの50%を阻害することができた。特に化合物1b-1のIC₅₀はアドリアマイシンのIC₅₀とよく一致する。

本発明の化合物をアドリアマイシン耐性の細胞系MCF-7/ADRで試験すると、試験化合物のIC₅₀は、0.05から1.6μMに増加し、MCF-7/ADR細胞に対するIC₅₀の、MCF-7細胞に対するIC₅₀への耐性比率は、1.9から2.4になった。これとは対照的に、アドリアマイシンとともに増殖したMCF-7/ADR細胞に対するIC₅₀は4μMであり、比率は200であった。ミトキサントロンとともに増殖したMCF-7/ADR細胞に対するIC₅₀もまた4μMであったが、MCF-7/ADR細胞に対するIC₅₀の、MCF-7細胞に対するIC₅₀への比率は800であった。

細胞系8226、8226/MT（ミトキサントロン耐性）及び8226/ADR（アドリアマイシン耐性）とともに試験したときにも、同様な結果が得られた。化合物1a-1及び1b-1は非常に低い濃度で³H-チミジンの取り込みを阻害することができた。化合物1a-1のIC₅₀は1μMであった。化

合物1b-1のIC₅₀は0.06μMであった。試験したその他の化合物のIC₅₀は10.2及び15μMであった。化合物1a-1及び1b-1を細胞系8226/MTとともに試験したところ、IC₅₀はそれぞれ0.24及び0.008であり、また8226細胞のIC₅₀の、8226/MT細胞のIC₅₀に対する比率は、それぞれ0.24及び0.13であった。これらの結果は、アドリアマイシン又はミトキサントロンとともに増殖した細胞から得た結果とよく一致した。アドリアマイシンとともに増殖した細胞については、8226/MT細胞のIC₅₀の、8226細胞のIC₅₀に対する比率は1μMであった。ミトキサントロンとともに増殖した細胞については、8226/MT細胞のIC₅₀の、8226細胞のIC₅₀に対する比率は3.5であった。

アドリアマイシン耐性8226細胞とともに試験した化合物もまた同様の結果を示した。8226/ADR細胞のIC₅₀の、8226細胞のIC₅₀に対する比率が、試験化合物では0.08μMから1.4μMまでなのと比較して、アドリアマイシン及びミトキサントロンではそれぞれ11.4μM及び6μMの耐性比率であることにより示されるように、試験化合物はアドリアマイシンと交差耐性ではなかった。

これらの結果は、本発明の化合物が腫瘍細胞の増殖を阻害するのに効果的であり、かつアドリアマイシン又はミトキサントロンと交差耐性でないことを示している。

表6

化合物	MCF-7	MCF-7/ADR	耐性比率
1a-1	0.25	0.5	2
1a-2	7.4	16	2.2
1a-3	7.4	14.1	1.9
1b-1	0.025	0.06	2.4
ADR	0.02	4	200
MT	0.005	4	800

表7

化合物	8226	8226/MT	耐性比率	8226/ADR	耐性比率
1a-1	1	0.24	0.24	0.08	0.08
1a-2	10.2			14.1	1.38
1a-3	15			16.3	1.08
1b-1	0.06	0.008	0.13	0.016	0.26
1c-1	18			25	1.4
ADR	0.05	0.05	1	0.57	11.4
MT	0.03	0.105	3.5	0.18	6

実施例10：ヒト骨髄腫の阻害

第2世代にある増殖中の骨髄腫細胞（Clonetics Inc., San Diego, California）から購入したNHEK細胞（骨髄腫細胞増殖株（KGM: Clonetics Inc.）中で生育する。細胞を0.025%トリプレチン（Clonetics）でトリプレチン処理し、血球計数器でカウントして、96ウェルのマイクロタイタープレート中に2,500細胞/ウェルの濃度で接種する。一夜かけて細胞を表面に固着させた後、増殖を吸引して、新しいKGM100μlで置き換える。試験物質を希釈し、実施例9に記載した³H-チミジンの取り込み法によってIC₅₀を測定した。

この実験の結果は表8に示す。この結果は、本発明の化合物がヒト骨髄腫細胞に対して活性であり、骨髄腫の高増殖が要求である。細胞やその他の病状のような局所的な症状の治療に有用であることを示唆している。

表8

化合物	IC ₅₀ (μM)
1a-1	0.16
1b-1	0.04

実施例11: 好中球スーパーオキシドアニオン(O₂⁻)放出アッセイ

ヒト赤血球から集めた全血から好中球を分離した。等張食塩水 (Travenol Lab., Inc., Deerfield, Illinois) 及びリンパ球分離液 (Organon Teknica, Durham, North Carolina) 以外の全ての試薬はSigma Chemical Companyから購入した。

好中球の集菌

全血を吸引して、凝集を防ぐためにヘパリンナトリウム (最終濃度10ユニット/ml) と混合した。等張食塩水中の等容のデキストラン (3.0%) を加えて、混合し、赤血球凝集 (RBC) と結合させるために30分間放置した。上清を除去して、リンパ球分離液で下層におき、遠心機 (Beckman GPR, Norcross, Georgia) 中、400xgで40分間遠心した。RBCを分解するために、ペレットを0.2%及び1.6% NaCl中に交互に再懸濁した後、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) で洗浄した。洗浄ペレットを10ml HBSSに再懸濁して、血球計数器でカウントするまで氷上に保存した。

アッセイ方法

好中球細胞の濃度をHBSSで 2×10^6 細胞/mlに調整した後、0.8mlの細胞を12x75mmのポリプロピレン試験管 (Fisher Scientific) に加える。用量応答性を測定するために試験物質を希釈し、2重試験において、0.1ml/試験管の容量で、10x最終濃度で加える。次いで10x濃度のチトクロームC (15mg/ml) を、カタラーゼ (3000ユニット

ト/ml) 単独か、或いは25ng/mlのホルボール12-ミリステート13-アセテート (PMA) を含むか、のいずれかとし、0.1ml/試験管の容量で加えて、37℃で30分間インキュベーションした後、試験管を氷上に置くことによって反応を停止する。次いで試験管を900xgで10分間遠心し、上清0.5mlを除去して、ミクロキュベット中の水0.5mlに加える。チトクロームCの550nmにおける吸光度 (OD) をスペクトロフォトメーター (Hitachi) で測定する。PMA-刺激した試験管と、しない試験管の間の吸光度の差 (ΔOD) を得て、試験物質の用量応答性をポジティブコントロール (試験物質の代わりにHBSSを含む) と比較する。PMAはチトクロームCを減少させるO₂⁻生産を測定する。チトクロームCの減少はその吸光度を増加させ、チトクロームCのODにおける変化は、PMA刺激によって生産されたO₂⁻の量に比例する。本発明の化合物によるO₂⁻バーストの阻害は、吸光度の変化における減少によって観察される。阻害はIC₅₀μMで表され、これはPMA-刺激された呼吸性噴出、即ちO₂⁻生産の50%を阻害する。

試験化合物は、PMA-刺激された好中球によるO₂⁻生産を阻害することができた。表9に示すように、化合物1a-1 (塩基) は、6.25μMより大きなIC₅₀を有していた。化合物1a-1 (塩酸塩) 及び1b-1 (塩基) はそれぞれ12.5μM及び25μMより大きなIC₅₀を有していた。

表9

試験化合物	IC ₅₀ (μM)
1a-1 (塩基)	>6.25
1a-1 (塩酸塩)	>12.5
1b-1 (塩基)	>25

実施例12: 腫瘍アッセイ

表10

% T/C (用量、方法)

化合物	P388白血腫
1a-1	130 (150mg/kg, Q1Dx9)
1a-1	140 (67mg/kg, Q1Dx9)
1b-1	140 (16mg/kg, Q4Dx3)

表10に示すように、化合物1a-1及び1b-1は、全ての用量及び方法において化合物で処理したマウスの生存期間を増加させた。

黒皮症性腫瘍 (melanotic melanoma) B16試験 使用した動物はB₆C₃F₁マウスで、全て同じ性であり、オスでは最低体重18gで、メスでは17gであり、試験開始時には全て4gの体重にであった。試験群は9又は10匹のマウスからなっていた。腫瘍発生量の部分1gを生理食塩水10mlにホモジェナイズすることによって調製した腫瘍ホモジェネート0.5mlを各試験マウスに皮下注射して腫瘍を移植した。ヒドロプロピルセルロースに懸濁した化合物1a-1を、腫瘍移植の日 (第0日とする) から数えて、第1日目から始めて9日間連続して、毎日1回、100mg/kgの投与量で腹腔内投与した。対照群のマウスにはヒドロプロピルセルロースのみを注射した。マウスの体重を測定し、60日において定期的に生存率を記録した。平均生存期間と、対照 (C) マウスに対する処理 (T) マウスの平均生存期間の比率とを計算した。非処理の腫瘍化マウスの平均生存期間は15から17日であった。生存期間に基づいて薬剤の有効性を評価した。結果は、対照生存期間のパーセント (生存期間 = $T/C \times 100\%$; T=試験動物; C=対照動物) で表した。有効性の評価は、 $T/C \times 100 \geq 125$ パーセントによって決定した。

試験化合物1a-1の%T/Cは129であり、これは化合物1a-1が、この化合物で処理したマウスの生存期間を増加することに有効であることを示唆している。

P388 白血病腫瘍 使用マウスはCharles River Laboratoriesから購入した若い成育した、病原菌をしない、BALB/c x DBA/2 F1 (即ち、CD2F1) メスであった。腫瘍系は、ナシナル・キャンサー・インスティテュート (NCI) Tumor Repository (Frederick, MD) から得たP388マウス白血病。腫瘍発生型であった。腫瘍は定期的にマウスの腹腔内 (i.p.) に移植して継代維持した。この試験では、血球計数器でカウントした10⁶個のP388マウス白血病細胞を0日目にマウスにi.p.移植した。マウスは各6匹のマウスからなる20及び15の試験群の中の1つの未処理対照群中に無差別に入れた。全ての薬剤処置は各群の平均体重に基づいてi.p.で投与した。全ての薬剤は注射用滅菌食塩水に溶解し、全ての薬剤は調整した全ての用量で可溶であった。使用した薬剤、用量、及び投与方法は以下の通りである: ミトキサントロン (ポジティブコントロール薬剤) は、第1日目から始めて4日毎に1回、1.2、1.8及び2.7mg/kg/投与で、合計3回注射した; 化合物1a-1は、第1日目から始めて4日毎に1回、100、150及び225mg/kg/投与で、合計3回注射した (Q4D x4); 化合物1a-1は、第1日目から始めて毎日9日間、67、100及び150mg/kg/投与で注射した (Q1D x9); そして化合物1b-1は、1a-1と同じ方法で投与したが、それぞれ10、7、16及び24mg/kg/投与、及び、3、5、5、3及び8mg/kg/投与の投与量で投与した。体重は第1、5、9、11及び18日目に記録した。死亡例は毎日記録した。死んだマウスは死体解剖に付し、腫瘍又は腫瘍の存在又は不存在を記録した。薬剤の有効性は生存期間に基づいて評価した。結果は、対照生存期間のパーセント (生存期間 = $T/C \times 100\%$; T=試験動物; C=対照動物) で表した。有効性の評価は、 $T/C \times 100 \geq 125$ パーセントによって決定した。

MCF-7ヒト乳癌細胞株。使用マウスは、Taconic Farmsから購入した若い成育した、無病原をもたない、NCr-Onu (無病原マウス)メスであった。MCF-7ヒト乳癌細胞はNCI Tumor Repositoryから得て、培養によって拡大し、マウス中での移植細胞として成長するように適応させ、そして皮下 (s.c.) 接種としてマウス中で連続的に維持した。エストロゲンのない1つの対照群 (10匹のマウス) を除く全てのマウスは、第0日に制御放出性エストラジオール錠 (Innovative Research of America, Toledo, OH) を皮下に移植した。第0日に腫瘍断片 (各々約30mg) を、エストラジオール移植の反対側の位置に実管針を用いて皮下移植した。エストロゲンのない対照群にもまた腫瘍断片を移植した。エストロゲンを移植したマウスは、30匹のマウスの対照群と、各10匹のマウスからなる5つの試験群とに無差別に入れた。いずれの薬剤も注射用滅菌食塩水中に溶解させ、いずれの薬剤も調製した投与量で可溶であった。5つの試験群には以下のようにして薬剤を投与した：アフリマイレン (ポジティブコントロール薬剤) は、第1日目から始めて4日毎に1回、3、3.5及び5mg/kg/投与で、合計3回注射した；化合物**1b-1**は、第1日目から始めて4日毎に1回、16、25及び40mg/kg/投与で、合計5回注射した。全ての薬剤処理は尾静脈を介してマウスに静脈内 (i.v.) 投与した。エストロゲンのない対照群と、エストロゲンを移植した対照群とは未処理であった。体重は第1、5、9、13、17、21、23及び30日目に記録した。死亡例は毎日記録した。マウスを毎日観察してs.c.腫瘍が発生したか確かめた。腫瘍は毎週2回、カリパス (のびす) で2つの寸法を測定した。長径楕円体 (prolate ellipsoid) についての公式を用いて腫瘍容量を計算し、この容量を換算定単位密度 (mass assuming unit density) に変換した。治療効果は、腫瘍成長の遅延 (T-C)、腫瘍なしの生存、及び全体の生存に基づいて評価した。薬剤毒性は体重損失及び早死 (治療の完了と比較して) の死亡に基づいて評価した。

図4は、平均腫瘍重量 (mg) と、腫瘍移植後の日数との関係を示すグラフである。対照群マウス (エストロゲンI.M.P.) の結果は図4に示す。化合物**1b-1**の腫瘍重量は図4に示す。図4に示すように、**1b-1**で処理したマウスの腫瘍成長は、約30日目に、対照群マウスの重量よりも有意に低い重量で安定化した。処理マウスの平均腫瘍重量は、腫瘍の再成長が開始して増加し始める約38日目まで安定であった。

図1

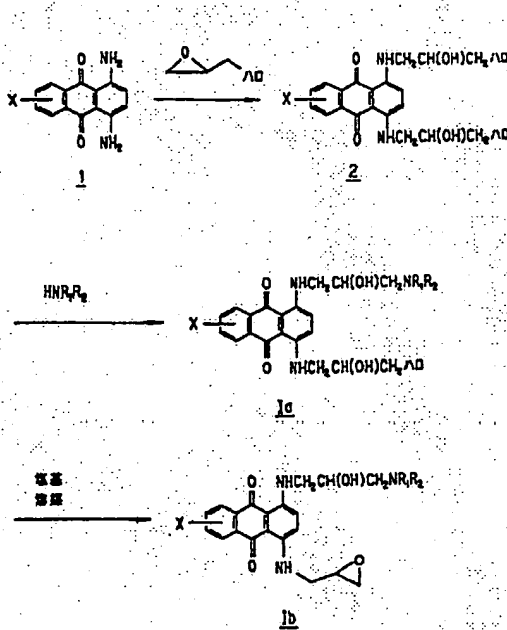
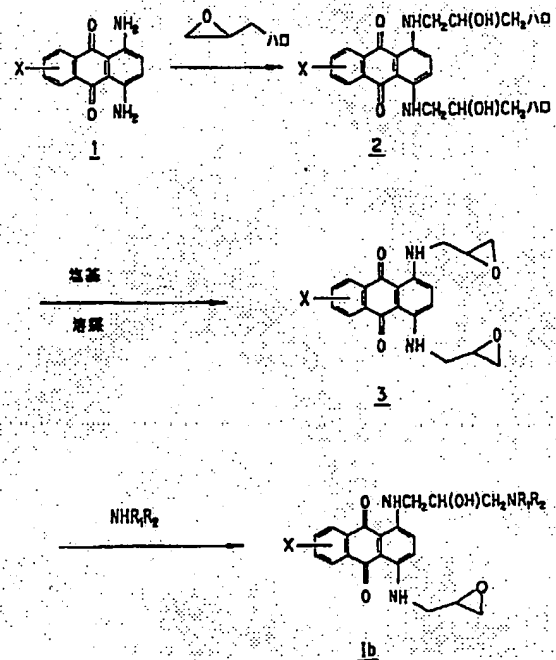


図2





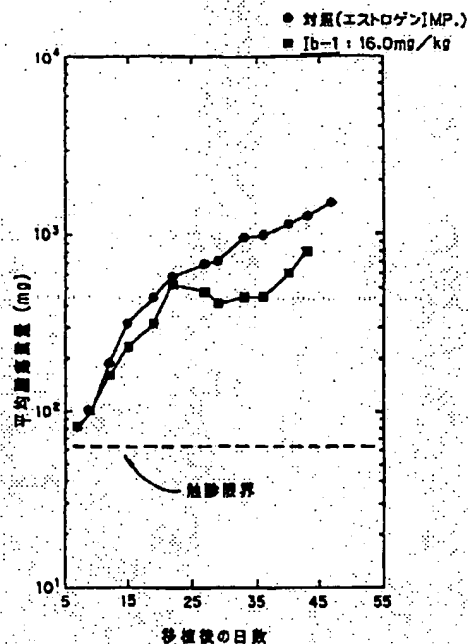
要約

*c1ccc2c3c(c1)c(=O)c4c3c(=O)c5c4c(NCC(O)CC)cc5

〔式中〕

R₁、及びR₂が独立にH、C₁-C₁₀アルキル、アリール、アリールアルキル、アルキルアリールであり、又はR₁、及びR₂は隣接する置換基原子と一緒になって環状又は非環状の環状基を形成し、この環はヘテロ原子を更に任意に含むことができ、n及びmが独立に1、2、又は3であり；Aがハロゲン、OH、アルコキシ、OCO(NR₁R₂)、S-C(NH₂)₂-NR₃であり、或いはm-1のときには隣接する置換基原子とともにオキシラン環を形成し；R₃、R₄、及びR₅が独立にH、アルキル、又はアリールであり；XがH、OH、NR₁R₂、Cl、Br、I、F、アルキル、アリール、アルコキシ、アリールオキシ、COOR₁、又はCONR₁R₂であり；そしてR₆、R₇、R₈、R₉、及びR₁₀が独立にH、低級アルキル、又はアリールである。

4



● 康 興 至 順 告

[illegible]

第1頁の続き

識別記号:

斤内整理番号

A 61 K 31/165
31/235
31/27
31/335
C 07 C 271/10
271/42
335/32
C 07 D 303/38

AED

8413-4C
8413-4C
8413-4C
7252-4C
6917-4H
6917-4H
8619-4H
7822-4C

優先權主張 ⊗1990年11月2日 ⊗米國(US) ⊗609,179

④発明者 ジョンソン、メアリー・ジョー
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州27510、カーボロ、ノース・
グリーンズボロ・ストリート 1601

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.